

*На правах рукописи*

**Тихонов Евгений Александрович**

**ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО  
БАРЬЕРА, ИММУННОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У  
КРЫС ВИСТАР**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на биологическом факультете Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор

**Макарова Ольга Васильевна**

доктор биологических наук, профессор

**Голиченков Владимир Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Воронцова Зоя Афанасьевна**

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник клинического отдела Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Щербаков Иван Тимофеевич**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Постнатальное развитие желудочно-кишечного тракта и одного из его отделов - толстой кишки - характеризуется структурными изменениями всех оболочек – слизистой, подслизистой основы, мышечной, а также иммунной и энтеральной нервной систем. Литературные сведения о возрастных изменениях толстой кишки у разных видов лабораторных животных фрагментарны и не систематизированы (Peck C.J., 2009; Castrogiovanni P., 2014; Cossais F. et al., 2016). Необходимость исследования структурных компартментов ободочной кишки (ОК) в разные возрастные периоды определяется тем, что в ряде работ показана связь многих заболеваний человека, таких как аутизм, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, атеросклероз, депрессия, сахарный диабет, ожирение, воспалительные заболевания кишечника со структурно-функциональными нарушениями толстой кишки и изменением состава колонизирующей ее микрофлоры (Nicholson J.K. et al., 2012; Pistollato F. et al., 2016; Gabbani T. et al., 2017). Кроме того, в последние десятилетия для коррекции состава микрофлоры у людей разных возрастных групп – от новорожденных до стариков – широко используются препараты микробного происхождения – пробиотики, пребиотики, симбиотики и др. Доклиническая оценка этих препаратов проводится, главным образом, на крысах, поэтому необходимо изучение морфофункциональных изменений ОК у этого вида лабораторных животных в процессе постнатального развития.

### **Степень разработанности темы исследования**

По сравнению с другими органами желудочно-кишечного тракта толстая кишка, функцией которой является абсорбция воды и формирование каловых масс, максимально заселена микрофлорой. Микрофлора, колонизирующая толстую кишку, играет важную роль в регуляции перистальтики, секреции, всасывания, синтезе биологически активных веществ (Hatton G.B. et al., 2015). При нарушении барьерных свойств слизистой оболочки толстой кишки бактерии могут транслоцироваться во внутреннюю среду организма и приводить к развитию воспалительного процесса – острого или хронического колита (Золотова Н.А., 2014).

Функционирование толстой кишки в физиологических условиях зависит от состояния эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем. Эпителиальный барьер ободочной кишки образован слизью, микрофлорой и эпителиальной выстилкой (Hatton G.B. et al., 2015). Выполняющая функцию иммунной защиты неинкапсулированная лимфоидная ткань ободочной кишки представлена одиночными и агрегированными лимфоидными узелками, диффузно рассеянными межэпителиальными лимфоцитами (Baptista A. et al. 2013). Регуляция моторной и секреторной функции ободочной кишки осуществляется энтеральной нервной системой, состоящей двух сплетений - межмышечного и подслизистого (Furness J.B., 2012).

Слизистая оболочка ОК у новорожденных крыс представлена «ворсинко-подобными структурами» (Pácha J., 2000). По сравнению с новорожденными в препубертатном возрастном периоде у крыс происходит увеличение линейных

размеров ОК, формирование крипт, структур иммунной системы, нервных отростков межмышечного нервного сплетения, колонизация желудочно-кишечного тракта бактериальной микрофлорой (Walthall K. et al., 2005; Kolling J. et al., 2012). Структурные и функциональные особенности проксимального и дистального отделов ОК у препубертатных, половозрелых и старых крыс в сравнительном аспекте не изучены.

Данные литературы о возрастных изменениях состава просветной микрофлоры в ОК крыс в литературе отсутствуют.

Эпителиальная выстилка толстой кишки образована колоноцитами и секреторными клетками – бокаловидными и энтероэндокринными. Бокаловидные клетки ОК секретируют муцины, которые являются основными структурными компонентами кишечной слизи. В зависимости от биохимических свойств концевых участков муцины делятся на нейтральные и кислые, а кислые - на сульфатированные и сиаломуцины (Johansson M. et al., 2011). Известно, что у новорожденных крыс в ОК преобладают сульфатированные и сиаломуцины (Pelaseyed T. et al., 2014). Региональные различия и цитофизиологические особенности бокаловидных клеток в период новорожденности у крыс не изучены. У мышей в препубертатном периоде в проксимальном отделе ОК увеличивается доля нейтральных муцинов, а в дистальном – не изменяется (Sultan I. et al., 2010; Ganesh B.P. et al., 2013). У половозрелых крыс бокаловидные клетки в проксимальном отделе ОК продуцируют, в основном, нейтральные и сиаломуцины, а в дистальном – нейтральные, сульфатированные и сиаломуцины (Merchant H.A. et al., 2014). В этот возрастной период в бокаловидных клетках дистального отдела ОК выше содержание кислых муцинов, а в проксимальном – нейтральных (Aslam A. et al., 2016). По сравнению с половозрелыми у старых крыс отмечено снижение численности бокаловидных клеток (Vaishnava S., 2016), но региональные отличия числа этих клеток и содержания в них разных муцинов у старых крыс не изучены.

Около 95% энтероэндокринных клеток в ОК у человека и лабораторных животных секретируют серотонин, который стимулирует абсорбцию, перистальтику и ускоряет транзит содержимого кишечника (Chalazonitis A. et al., 2012). Показано, что у половозрелых крыс количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате кишки выше в проксимальном отделе ОК по сравнению с дистальным (Oshima S.I. et al., 1999). В литературе отсутствуют данные о количестве энтероэндокринных клеток и содержании серотонина в разных отделах ОК у новорожденных, препубертатных и старых крыс.

Лимфоидная ткань кишечника, выполняющая функцию иммунной защиты, представлена в стенке толстой кишки одиночными и агрегированными лимфоидными узелками (Baptista A. et al., 2013). Данные о количестве агрегированных лимфоидных узелков, их площади и числе узелков в проксимальном и дистальном отделах ОК у новорожденных и препубертатных крыс в литературе отсутствуют. У старых крыс структурно-функциональная оценка агрегированных лимфоидных узелков в разных отделах ОК не проводилась.

Энтеральная нервная система – собственная нервная система желудочно-кишечного тракта - является одним из отделов автономной нервной системы (Furness J.B., 2006). Известно, что нервная сеть кишечника, представленная двумя

крупными сплетениями — межмышечным и подслизистым, у крыс в период новорожденности не сформирована (Furness J.B., 2012). Сравнительное исследование гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения у новорожденных в проксимальном и дистальном отделах ОК ранее не проводилось. К препубертатному возрастному периоду у крыс межмышечное нервное сплетение организовано в сеть, которая состоит из ганглиев, соединенных так называемыми «межганглионарными трактами» (Vries de P. et al., 2010). По сравнению с периодом новорожденности в препубертатном периоде в ганглиях увеличивается число нейронов и глиальных клеток (Matini P. et al., 1997). Однако остаются неизученными изменения площади, числа ганглиев и их клеточного состава в разных отделах ОК. Данные литературы об изменении площади и числа ганглиев в проксимальном и дистальном отделах ОК у половозрелых крыс отсутствуют. По сравнению с половозрелыми у старых крыс число ганглиев межмышечного нервного сплетения в ОК не изменяется, а общее число нейронов и глиальных клеток в них снижается (Phillips R.J. et al., 2004). Однако сведения об изменении площади ганглиев, их клеточного состава в проксимальном и дистальном отделах ОК отсутствуют.

Таким образом, представленные в литературе сведения о морфофункциональных изменениях ОК и ее отделов в постнатальном онтогенезе у крыс являются неполными и не систематизированными.

**Цель исследования** - охарактеризовать структурную организацию эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп.

#### **Задачи исследования**

1. Охарактеризовать морфологические изменения ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
2. Исследовать состав просветной микрофлоры у крыс Вистар разных возрастных групп
3. Определить цитофизиологические особенности бокаловидных клеток в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
4. Выявить возрастные изменения популяции энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у крыс Вистар
5. Оценить гистофизиологические особенности агрегированных лимфоидных узелков ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
6. Выявить возрастные изменения гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар

**Объект и предмет исследования** – эпителиальный барьер, локальный компартмент иммунной и нервной систем ободочной кишки, их возрастные изменения.

**Теоретической и методологической базой** диссертационного исследования являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященные возрастным изменениям эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем ободочной кишки.

**Информационной базой исследования** являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

**Диссертация соответствует Паспорту научной специальности 03.03.04** клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5, 6, 7.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что в постнатальном развитии у крыс рост линейных размеров ободочной кишки от новорожденного до препубертатного возрастного периода сопровождается выраженными структурными изменениями эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем, состава бактериальной микрофлоры.

Выявлены возрастные и региональные цитофизиологические особенности бокаловидных клеток ободочной кишки. Во всех возрастных группах в дистальном отделе по сравнению с проксимальным их численность больше. В проксимальном отделе содержание кислых муцинов в бокаловидных клетках снижается к периоду половой зрелости, а нейтральных – к старости.

В процессе постнатального развития у крыс впервые охарактеризован состав основных таксонов просветной микрофлоры, и показано, что он устанавливается у половозрелых животных и сохраняется у старых.

Численность популяции энтероэндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс увеличивается с возрастом, что коррелирует с повышением содержания серотонина в ободочной кишке и периферической крови. В проксимальном отделе у препубертатных, половозрелых и старых животных энтероэндокринных клеток больше, чем в дистальном, а у новорожденных региональные различия отсутствуют.

С возрастом у крыс увеличивается площадь агрегированных лимфоидных узелков; в дистальном отделе ободочной кишки она выше, чем в проксимальном, и в них больше число лимфоидных узелков.

Сеть межмышечного нервного сплетения у крыс в период от новорожденности до препубертатного становится более разреженной. С возрастом увеличиваются размеры ганглиев, число глиальных клеток в них, а также толщина внутримышечных нервных отростков, но количество последних снижается.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в работе теоретические данные расширяют и систематизируют существующие представления о возрастных морфологических изменениях ободочной кишки у крыс и могут быть использованы в качестве базовых при планировании и проведении исследований по структурным особенностям индивидуального развития желудочно-кишечного тракта у человека и лабораторных животных. Результаты работы могут быть использованы для разработки новых доказательных подходов к доклинической оценке эффективности

бактериальных препаратов с учетом возрастных особенностей, а также включены в программы преподавания на кафедрах биологических и медицинских вузов.

### **Методология и методы исследования**

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: морфологические, анатомические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, полимеразная цепная реакция в реальном времени, статистические методы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В постнатальном онтогенезе у крыс Вистар наиболее значимые структурно-функциональные изменения ободочной кишки наблюдаются в период от новорожденности до препубертатного.

2. В период новорожденности, в отличие от незрелой иммунной и нервной систем, эпителиальный барьер сформирован – число бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке и содержание в них сульфомуцинов и сиаломуцинов соответствует другим возрастным периодам, а количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в кишке и крови минимальное

3. В препубертатный период в ободочной кишке формируются крипты, структуры межмышечного нервного сплетения, в его ганглиях возрастает число глиальных клеток. По сравнению с другими возрастными периодами количество агрегированных лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки максимальное.

4. В периоды половой зрелости и старости отмечаются функциональные изменения эпителиального барьера - в бокаловидных клетках снижается содержание муцинов, наиболее устойчивых к действию бактериальных гликозидаз. Состояние иммунной и нервной систем в эти возрастные периоды не изменяется по сравнению с препубертатными животными.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных методов исследования, корректным применением статистических методов анализа, критическим анализом результатов исследования в сопоставлении с актуальными литературными данными.

**Материалы диссертации доложены:** на Всероссийской научной конференции «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), международной конференции «PhD Scientific Days 2017» (Будапешт, 2017).

**Личное участие автора** заключалось в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 5 - статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. 3 публикации - в материалах конференций и съездов.

**Внедрение результатов работы.** Материалы диссертационного исследования используются в преподавании на кафедре эмбриологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 15 российских и 119 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 27 рисунками.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 100 самцах крыс Вистар разных возрастных групп: новорожденных (2-4 сут), препубертатных (25-30 сут), половозрелых (3 мес), и старых (18-24 мес). В зависимости от использованного метода в каждой возрастной группе было по 6-7 животных. Крысы были получены из филиала "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №15 от 16.12.2014).

Крыс содержали в открытой системе при температуре 18-25°C при естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92).

Поскольку доклиническая оценка эффективности бактериальных препаратов чаще всего проводится на крысах, этот вид лабораторных животных был использован нами в эксперименте (Каркищенко Н.Н., Грачев С.В., 2010). Выбор периодов постнатального развития обусловлен тем, что в период новорожденности у крыс кишечник колонизируется микрофлорой, не развита регуляция моторики кишечника (Carloni M. et al., 2012). У препубертатных животных происходит переход на твердый корм и смена состава микрофлоры (Agans R. et al., 2011). У половозрелых животных состав микрофлоры стабильный, и у них развита моторная функция ободочной кишки (Hatton G.B. et al., 2015). По данным литературы, к старости у крыс снижается частота и амплитуда сокращений кишечника (Merchant H.A. et al., 2014).

**Анатомический метод.** Для четкой визуализации агрегированных лимфоидных узелков на толстую кишку накладывали лигатуры, вводили в просвет кишки 2% водный раствор уксусной кислоты, затем поперечным разрезом разделяли ОК на проксимальный и дистальный отделы. Через сутки после фиксации полученные фрагменты проксимального и дистального отделов ОК вскрывали по брыжеечной линии, отмывали от содержимого и расправляли на бумаге черного цвета по методике, предложенной J. Bienenstock and R. Clancy (1976).

**Гистологические методы.** Для гистологического исследования ОК разделяли на два отдела – проксимальный и дистальный - фиксировали в жидкости Буэна, заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5-8 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

**Гистохимические методы.** Для выявления в бокаловидных клетках высокосульфатированных и нейтральных муцинов проводили окраску альциановым синим pH 1.0 по Моури (Гистолайн, ООО «Элемент», Россия) и ШИК-реакцию (БиоВитрум, Россия), соответственно (Wulff S., 2004).

**Иммуногистохимические методы.** Энтероэндокринные клетки выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal anti-Chromogranin A antibody, ab15160, Abcam, Великобритания), в разведении 1:400. В качестве вторых

антител использовали коммерческий раствор синтетического полимера, связанного с пероксидазой хрена – Simple Stain Mouse MAX PO (R) (N-Histofine Universal Immuno-peroxidase polimer for mouse tissue Anti-Rabbit Redy-to-use, Nichirei Bioscience Inc., Япония). В качестве системы визуализации антител применяли набор N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония).

**Иммунофлуоресцентные методы.** Иммунофлуоресцентное исследование межмышечного нервного сплетения проводили на гистологических срезах и тотальных препаратах мышечной оболочки ОК. С целью маркирования межмышечного нервного сплетения и внутримышечных нервных отростков применяли антитела к  $\beta$ III-тубулину (ab18207, Abcam, США). На гистологических срезах мышечной оболочки ОК определяли клеточный состав ганглиев. С целью выявления тел нейронов и глиальных клеток применяли, соответственно, антитела к HuC/D (ab184267, Abcam, США) и S100b (ab868, abcam, США). В качестве флуоресцентной метки для HuC/D служил стрептавидин, конъюгированный с Alexa Fluor 555 (Thermofisher, S21381, США) в разведении 1:100; для  $\beta$ III-тубулина и S100b применяли Alexa-Fluor 488 goat-anti-rabbit (Life technologies, США) в разведении 1:100.

**Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.** Концентрацию серотонина определяли в гомогенатах проксимального и дистального отделов ОК (S. Oshima et al., 1999) и плазме периферической крови (J. Chen et al., 2001) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1260 Infinity Nanoflow LC (Agilent, США).

**Морфометрические методы.** Для оценки у крыс Вистар разных возрастных групп морфологических особенностей ОК окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты проксимального и дистального отделов фотографировали на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Австрия) с объективом x10. Выбирали участки с продольно ориентированными криптами. Определяли показатели длины ОК, толщины слизистой оболочки, подслизистой основы, циркулярного слоя мышечной оболочки, глубины и числа крипт.

На срезах проксимального и дистального отделов ОК подсчитывали количество визуализируемых бокаловидных клеток (ШИК-реакция) на стандартной единице площади эпителия ( $1 \text{ мм}^2$ ), определяли интенсивность окрашивания секрета бокаловидных клеток (ШИК-реакция и альциановый синий) в программе PhotoM1.21 (freeware, разработчик А. Черниговский, 2000–2001, [http://t\\_lambda.chat.ru/](http://t_lambda.chat.ru/)).

Оценивали относительное число энтероэндокринных клеток, выявляемых при реакции с антителами к хромогранину А, на стандартной единице площади эпителия ( $1 \text{ мм}^2$ ).

Для характеристики возрастных и региональных изменений иммунной системы ОК расправляли на бумаге черного цвета и фотографировали (фотокамера "Premiere" SMZ05). На полученных цифровых фотографиях при помощи морфометрической программы "Image-Pro Plus 6.0" определяли число агрегированных лимфоидных узелков на стандартной единице площади ОК ( $1 \text{ см}^2$ ), их площадь и число лимфоидных узелков.

Для выявления возрастных изменений межмышечного нервного сплетения на тотальных препаратах, окрашенных антителами к  $\beta$ III-тубулину, оценивали среднюю площадь межганглионарных пространств (мкм<sup>2</sup>) и толщину соединяющих ганглии нервных трактов (мкм). Для компьютерной обработки полученных изображений использовали программу ImageJ (Fiji, free software).

На гистологических срезах, окрашенных антителами к  $\beta$ III-тубулину, определяли число ганглиев (на 1 мм длины кишки), и их площадь (мкм<sup>2</sup>). В циркулярном слое мышечной оболочки оценивали число и толщину (мкм) профилей нервных отростков на стандартной единице площади (1 мм<sup>2</sup>).

Проводили подсчет числа нейронов и глиальных клеток в ганглиях на гистологических срезах мышечной оболочки ОК, окрашенных, соответственно, антителами к HuC/D и S100b.

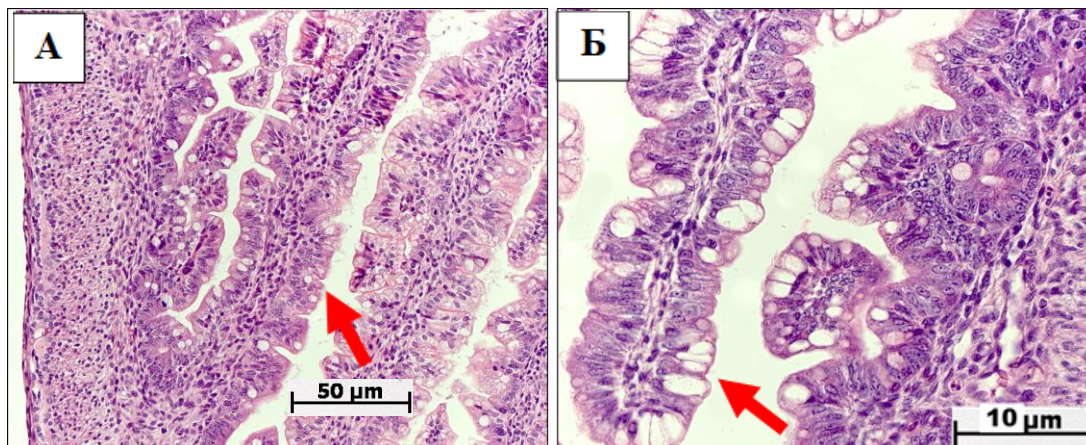
**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.** Проводили оценку уровня экспрессии мРНК основных таксонов: *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* в кале (просветная микрофлора) у животных разных возрастных групп. Использовали праймеры и программу амплификации, предложенные С. Nasuti et al. (2016). Считывание показателей флуоресценции и их интерпретацию в виде значений пороговых циклов (Cp) осуществляли автоматически в соответствии с алгоритмом разработчика (амплификатор DT-Prime, НПФ ДНК-Технология, Россия). Выбирали референсный таксон (*Firmicutes*), относительно которого оценивали долю (%) основных таксонов в каждом образце.

**Статистические методы.** Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., США), руководствуясь методическим пособием по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований (Мастицкий С. Э., 2009). При проведении анализа на нормальность распределения (по результатам теста  $\chi^2$ ) был выбран метод непараметрической статистики. Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи, для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA Крускала-Уоллиса «multiple comparisons of mean ranks for all groups». Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки  $p < 0,05$ . Для оценки корреляции между показателями числа энтероэндокринных клеток, концентрацией серотонина в гомогенате кишки и плазме крови применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

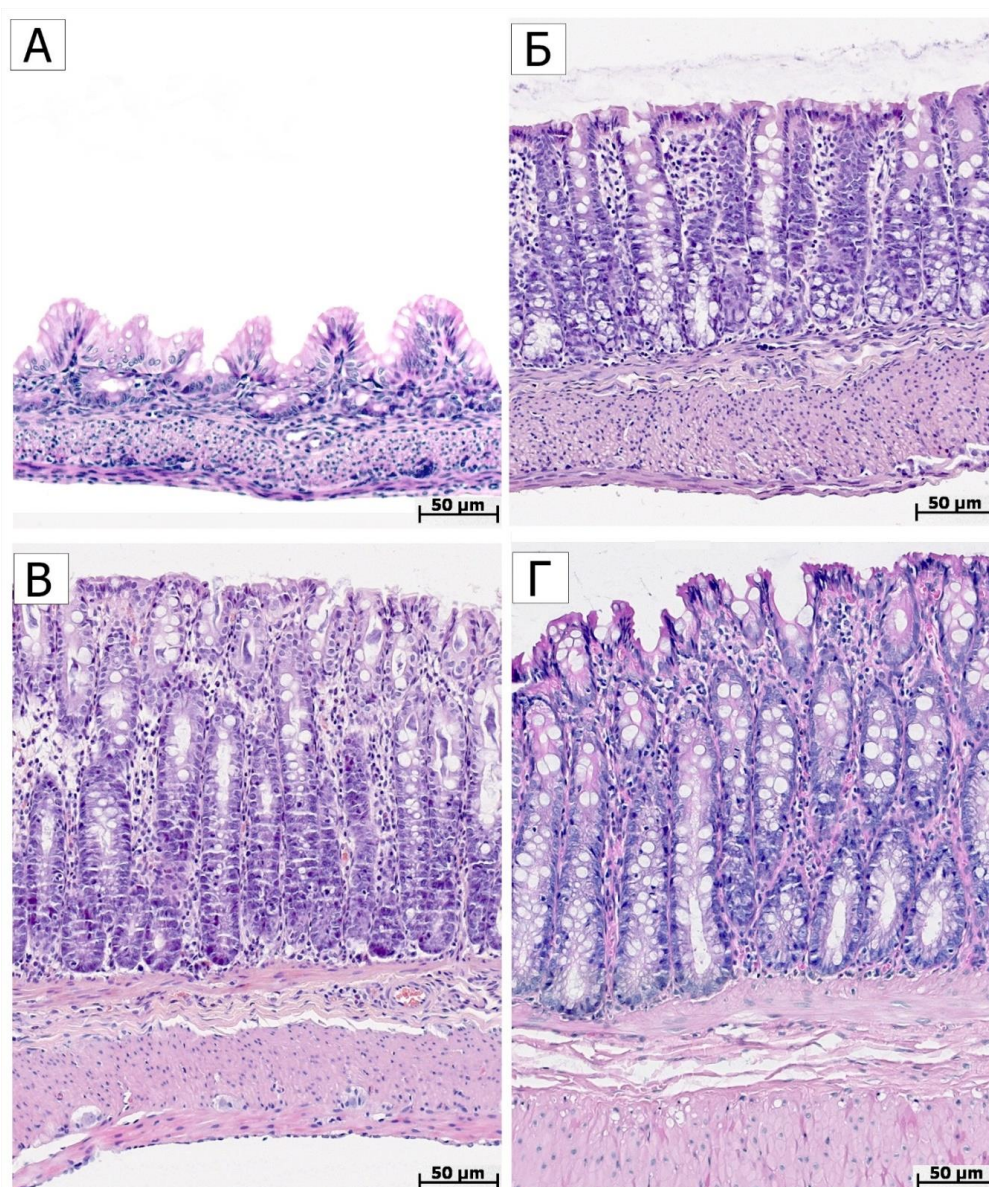
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Возрастные изменения структур стенки ободочной кишки.** В период новорожденности стенка ободочной кишки и составляющие ее структурные компоненты тонкие, в слизистой оболочке крипт мало, они неглубокие с широкими просветами. В проксимальном отделе выявлялись «ворсинко-подобные структуры» (Рисунок 1А,Б). По сравнению с новорожденными у препубертатных животных отмечалось увеличение толщины всех оболочек ОК. У половозрелых и старых животных их размер на качественном уровне не различался (Рисунок 2В,Г). Длина ОК прогрессивно увеличивалась от периода новорожденности к старости.





**Рисунок 1. Морфологическая характеристика проксимального отдела ободочной кишки у крыс Вистар в период новорожденности. Стенка ободочной кишки тонкая (А), в слизистой оболочке крипты не сформированы, визуализируются «ворсинко-подобные структуры» ↑ (Б). Окраска гематоксилином и эозином**



**Рисунок 2. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп. А – новорожденные; Б – препубертатные; В – половозрелые; Г – старые. Окраска гематоксилином и эозином**

Данные, полученные на качественном уровне, подтверждены определением показателей толщины структур ОК (Рисунок. 3). В проксимальном отделе в период от новорожденности до препубертатного отмечался рост толщины слизистой оболочки, глубины крипт и мышечной оболочки в 4-6 раз. В дистальном отделе эти изменения были менее выражены. По данным литературы увеличение толщины мышечной оболочки связано с повышением числа и размеров гладких миоцитов, а также количества эластических и коллагеновых волокон (Bitar K. V., 2003).

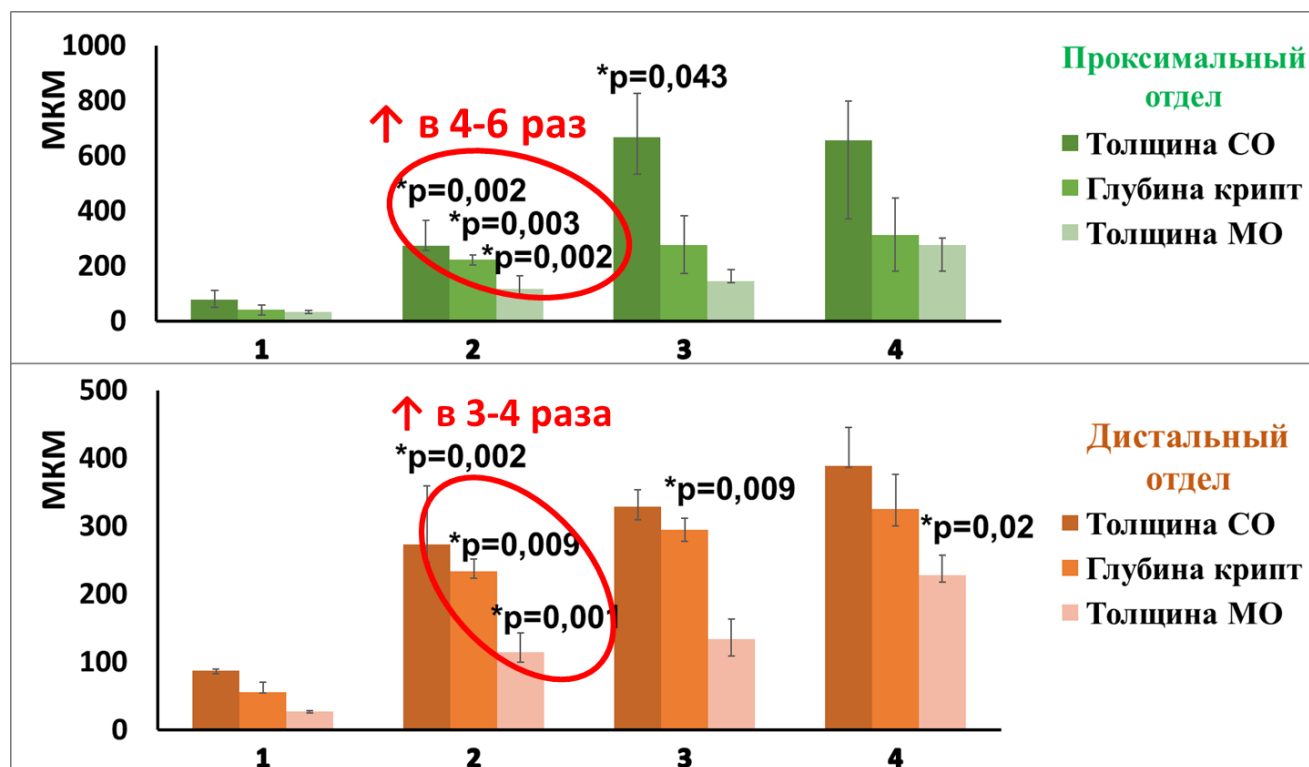


Рисунок 3. Морфометрическая характеристика проксимального и дистального отделов ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар в динамике развития. Возрастные группы: 1 – новорожденные; 2 – препубертатные; 3 – половозрелые; 4 – старые. СО – слизистая оболочка; МО – мышечная оболочка. Me (L25;U75). ANOVA Крускала-Уоллиса: \* - при  $p < 0,05$  различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой

### МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ У КРЫС ВИСТАР

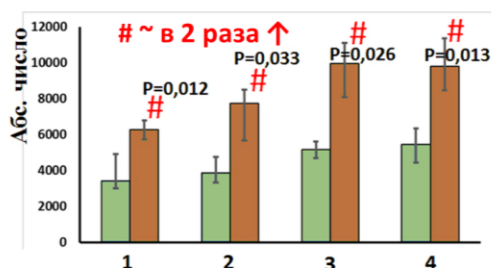
Эпителиальный барьер ОК представлен слизью, колонизирующей ее микрофлорой, и эпителием. Эпителиальная выстилка ОК образована выполняющими абсорбционную функцию колоноцитами и двумя типами секреторных клеток – бокаловидными и энтероэндокринными. Бокаловидные клетки продуцируют муцины, которые являются основным структурным компонентом слизи. Кишечная слизь препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов, механическому повреждению слизистой оболочки, служит субстратом для комменсальной микрофлоры (Золотова Н.А., 2014). Большинство энтероэндокринных клеток являются серотонин-продуцирующими (Яглов В.В.,



Яглова Н.В., 2017). Серотонин регулирует абсорбцию, моторику кишечника, и пролиферацию эпителия.

**Цитофизиологическая характеристика бокаловидных клеток в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар.** По данным гистохимического исследования количество бокаловидных клеток в период от новорожденности до старости не изменялось, но в дистальном отделе во все возрастные периоды их количество было больше, чем в проксимальном (Рисунок 4). Это связано с большим количеством бактерий в дистальном отделе по сравнению с проксимальным (Matsuo K. et al., 1997).

**Количество бокаловидных клеток на 1мм<sup>2</sup> эпителия**



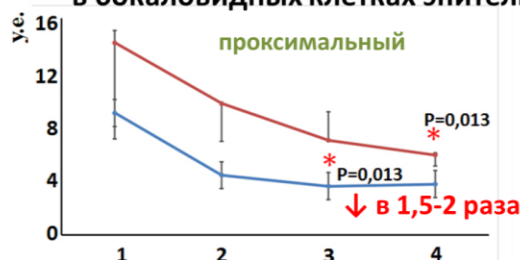
Отделы ободочной кишки:

- проксимальный
- дистальный

# - при  $p < 0,05$  различия значимы между отделами кишки в одной возрастной группе

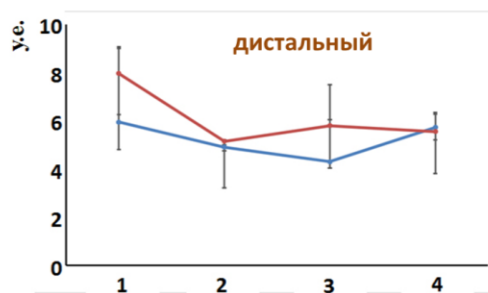
**Содержание нейтральных и высокосульфатированных муцинов**

**в бокаловидных клетках эпителия**



Возрастные группы:

- 1 – новорожденные
- 2 – препубертатные
- 3 – половозрелые
- 4 – старые



Муцины:

- высокосульфатированные
- нейтральные

\* - при  $p < 0,05$  различия значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой

**Рисунок 4. Количество бокаловидных клеток и содержание в них муцинов у крыс разных возрастных групп, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы: \* - при  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе (ANOVA Крускала-Уоллиса)**

Бокаловидные клетки продуцируют нейтральные ШИК-позитивные и кислые альциан-позитивные муцины, роль последних особенно важна, поскольку они высокоустойчивы к бактериальным гликозидазам (Deplancke B., Gaskins R., 2001). На качественном уровне в разные периоды постнатального развития содержание муцинов варьировало. По данным количественной оценки нами показано, что в проксимальном отделе ОК в период от новорожденности до половой зрелости в 1,5 раза снижалось содержание кислых муцинов, а нейтральных – к старости (Рисунок 4). Возрастных изменений содержания муцинов в дистальном отделе ОК не выявлено. Снижение содержания кислых высокоустойчивых к бактериальным гликозидазам муцинов с возрастом, обуславливает увеличение частоты встречаемости воспалительных заболеваний кишечника у человека в периоды половой зрелости и старости (Ruel J. et al., 2013).

## Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры в разные периоды постнатального развития у крыс Вистар

Существенную роль в защите организма от патогенов играет микрофлора, которая вместе с эпителиальным барьером и слизью образует биопленку. Литературные данные о возрастных изменениях просветной микрофлоры ОК у крыс отсутствуют. С. Carloni and C. Nasuti (2012) выявляли 5 основных таксонов микрофлоры у препубертатных и половозрелых крыс Вистар: *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae*. Соотношение экспрессии этих таксонов определялось методом количественной ПЦР в реальном времени. Нами установлено, что у крыс во все возрастные периоды преобладает таксон *Firmicutes*, часть из которых – таксон *Clostridium* - продуцирует серотонин (Amreault P., 2013). В период новорожденности крысы находятся на молочном вскармливании, и в составе просветной микрофлоры обнаруживаются *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae*. В препубертатном периоде и особенно у половозрелых животных в рационе преобладает твердый корм. Поэтому величина относительной экспрессии *Bacteroides*, способствующих усвоению клетчатки (Nasuti S., 2016), к периоду половой зрелости увеличивается в несколько тысяч раз (Рисунок 5). При этом, другие таксоны, за исключением *Firmicutes*, напротив, почти исчезают.

Таким образом, у крыс нами впервые выявлены изменения соотношения основных таксонов просветной микрофлоры, которое устанавливается к периоду половой зрелости и остается стабильным у старых животных. Это, с одной стороны, свидетельствует о том, что соотношение основных таксонов микрофлоры у крыс, в первую очередь, зависит от рациона питания, а не от возраста. С другой стороны, вырабатываемый таксоном *Clostridium* (*Firmicutes*) серотонин способен влиять на многие физиологические процессы в организме во все периоды постнатального развития. По данным литературы, микрофлора определяет также морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой ОК, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также продукции биологически активных веществ - нейромедиаторов, витаминов, короткоцепочечных жирных кислот (Nicholson J.K. et al., 2012).

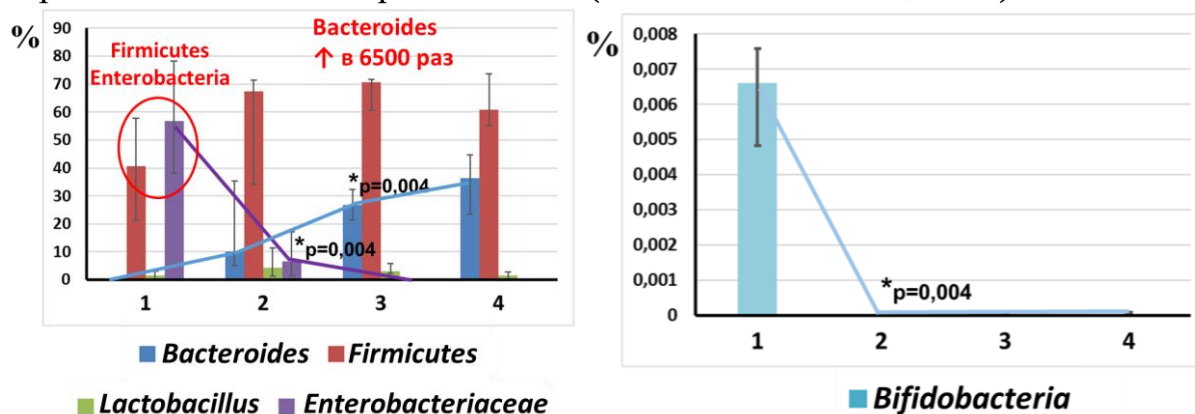


Рисунок 5. Возрастные изменения соотношения (%) основных таксонов просветной микрофлоры у крыс Вистар, Ме (L25;U75). Возрастные группы: 1 – новорожденные; 2 – препубертатные; 3 – половозрелые; 4 – старые. Различия статистически значимы при  $*p < 0,05$  по сравнению с новорожденными (ANOVA Крускала-Уоллиса)

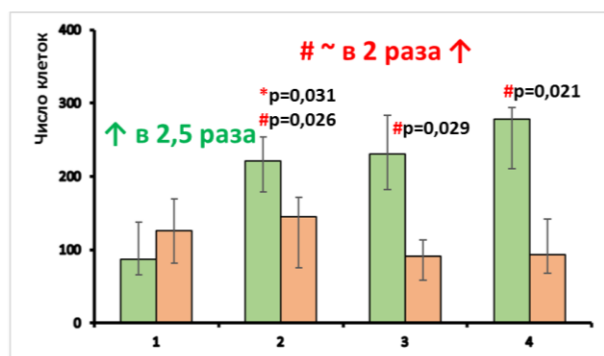
**Возрастные изменения популяции энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в ободочной кишке и периферической крови.** При иммуногистохимическом исследовании гистологических срезов ОК проводили подсчет энтероэндокринных клеток, выявляемых с помощью антител к белку хромогранину А. Большинство энтероэндокринных клеток ОК продуцируют серотонин, который попадает в кровь и депонируется в тромбоцитах (Castrogiovanni P., 2014). Кишечный серотонин способен к активации 14 различных рецепторов, расположенных на колоноцитах, нейронах энтеральной нервной системы, и иммунных клетках (Amireault P. et al., 2013). В процессе циркуляции тромбоциты периферической крови поглощают серотонин из ОК и высвобождают его в тканях. Серотонин стимулирует агрегацию тромбоцитов, иммунный ответ, развитие костной ткани (Mercado C. P. et al., 2013). На модели свободных от определенных патогенов мышей J.M. Yano et al. (2015) было показано, что «бактериальный» серотонин у половозрелых мышей составляет около 64% в гомогенате ОК и 49% в плазме крови. По данным других авторов у гнотобиотических мышей содержание серотонина в ОК не превышает 15% (Savelieva K.V. et al., 2008).

В составе эпителиальной выстилки у новорожденных крыс количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в ОК было минимальным по сравнению с другими возрастными периодами. Количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в проксимальном отделе ОК увеличивалось к препубертатному возрастному периоду в 2,5 и 50-80 раз, соответственно, и у половозрелых и старых крыс не изменялось (Рисунок 6). Возрастных изменений числа энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в дистальном отделе ОК не выявлено. Однако, установлено, что во все возрастные периоды, за исключением периода новорожденности, число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина было в 2 раза выше в проксимальном отделе ОК по сравнению с дистальным (Рисунок 6). Аналогичная возрастная динамика содержания серотонина наблюдалась и в плазме периферической крови (Рисунок 6). Это согласуется с данными литературы о том, что в проксимальном отделе по сравнению с дистальным более выражена моторная и секреторная функции (Merchant H.A. et al., 2014). Нами впервые выявлена прямая корреляционная связь высокой силы между числом энтероэндокринных клеток, содержанием серотонина в гомогенате ОК и плазме периферической крови.

Следует отметить, что серотонин продуцируется не только энтероэндокринными клетками, но и бактериальной микрофлорой, количество которой существенно увеличивается к препубертатному возрастному периоду (Yano J.M. et al., 2015). Таким образом, ключевыми факторами в постнатальном развитии моторной и секреторной функции ОК является увеличение числа серотонин-продуцирующих энтероэндокринных клеток, и колонизация кишечника бактериальной микрофлорой.



### Число энтероэндокринных клеток



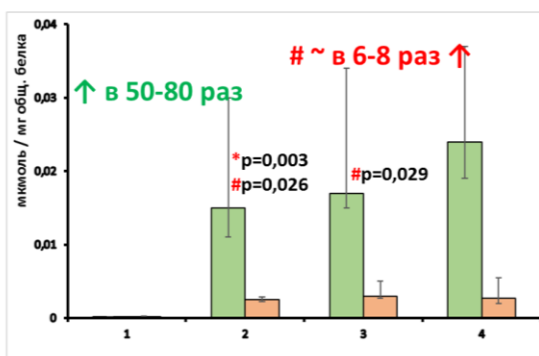
Отделы ободочной кишки:

- проксимальный
- дистальный

#### Возрастные группы:

- 1 – новорожденные
- 2 – препубертатные
- 3 – половозрелые
- 4 – старые

### Концентрация серотонина в гомогенате кишки



### Концентрация серотонина в плазме крови

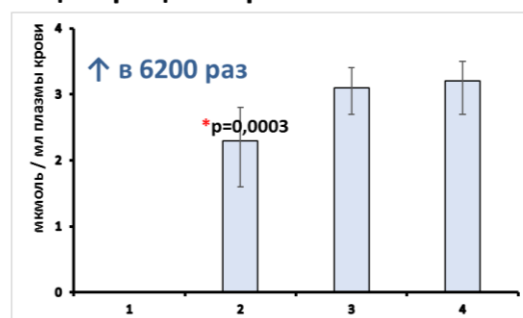
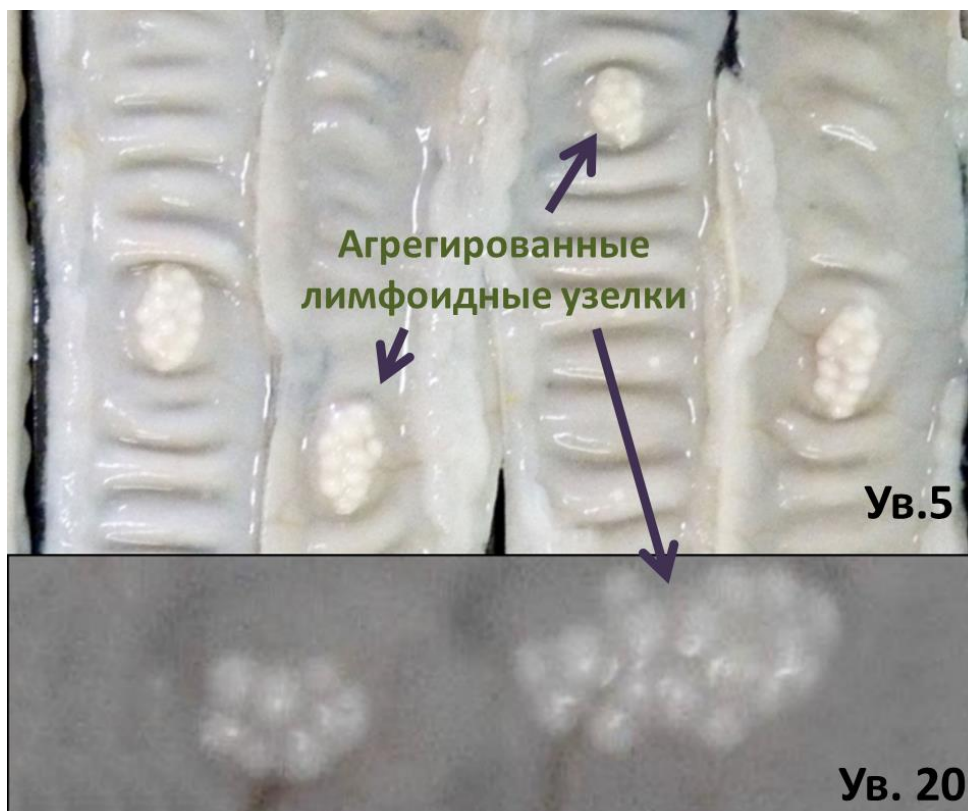


Рисунок 6. Возрастные изменения числа энтероэндокринных клеток, концентрации серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови у крыс, Me (L25; U75). Различия статистически значимы: \* - при  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе (ANOVA Крускала-Уоллиса)

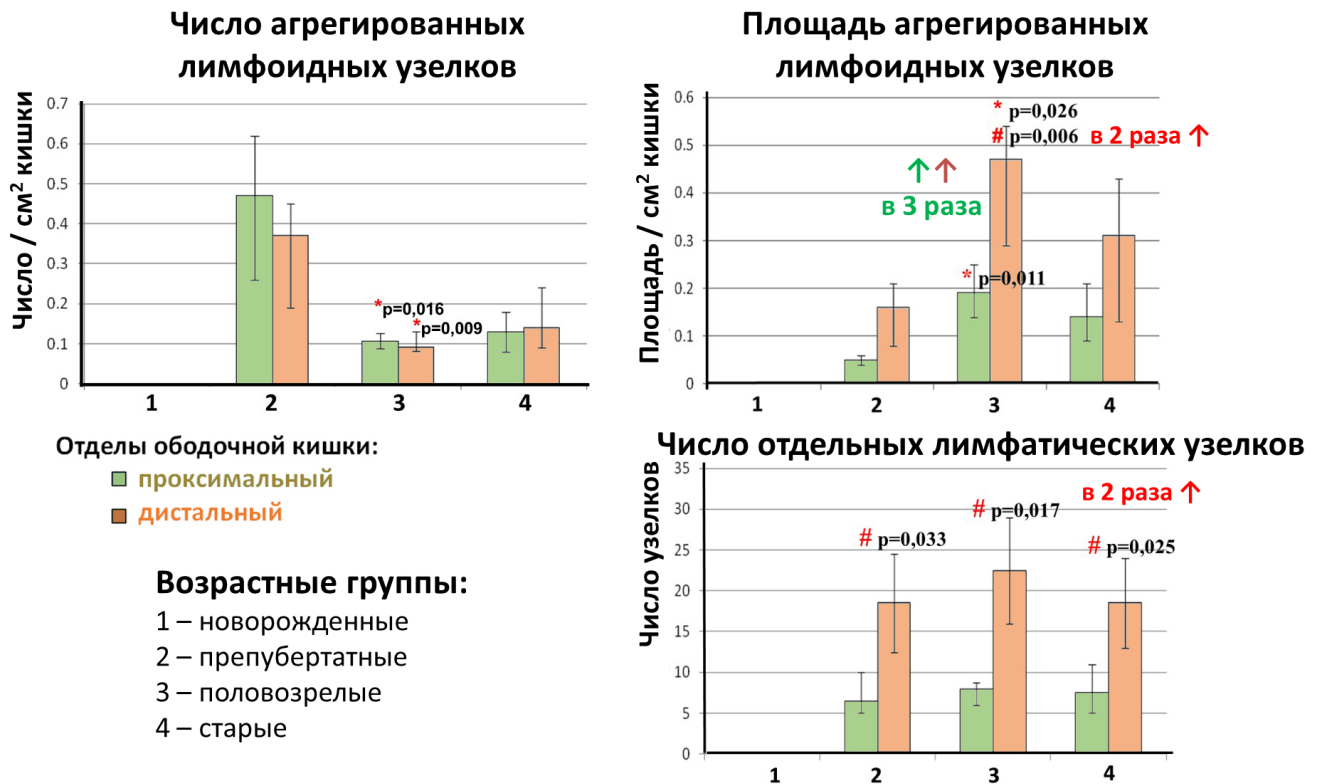
## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Иммунная система, выполняющая защитную функцию, представлена агрегированными и одиночными лимфоидными узелками (Рисунок 7). Ее структурно-функциональное состояние, главным образом, зависит от состава микрофлоры и пищевых антигенов. В отличие от других работ, мы определяли количественные параметры агрегированных лимфоидных узелков на тотальных препаратах, фиксированных в 2% растворе уксусной кислоты по методике, предложенной J. Bienenstock and R. Clancy (1976). В ряде работ оценка агрегированных лимфоидных узелков ОК проводилась на гистологических срезах, что не позволило оценить все лимфоидные узелки (Owen R.L. et al., 1991; Ishikawa H.I. et al., 2005).



**Рисунок 7. Макропрепарат ободочной кишки половозрелых самцов крыс Вистар, фиксированный в 2% водном растворе уксусной кислоты по J. Bienenstock and R. Clancy [26]. Видны агрегированные лимфоидные узелки**

Нами показано, что в период новорожденности агрегированные лимфоидные узелки у крыс отсутствовали. По данным литературы, в этот возрастной период в кишке обнаруживаются скопления клеток-индукторов лимфоидной ткани (Baptista A.P. et al., 2013). На нашем материале агрегированные лимфоидные узелки макроскопически визуализировались у препубертатных животных, в этот возрастной период их число на 1 мм<sup>2</sup> площади ОК было максимальным (Рисунок 7). Вследствие увеличения линейных размеров ОК к периоду половой зрелости их число в ОК снижалось. Средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков увеличивалась от препубертатного периода до половой зрелости в 3 раза и к старости не изменялась. В дистальном отделе ОК по сравнению с проксимальным у препубертатных, половозрелых крыс в 2 раза больше средняя площадь и число агрегированных лимфоидных узелков. Это, очевидно, связано с тем, что по сравнению с проксимальным в дистальном отделе ОК больше бактериальных антигенов (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Возрастные изменения числа агрегированных лимфоидных узелков, их площади, и числа лимфоидных узелков в них, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы: \* - при  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе (ANOVA Крускала-Уоллиса)

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИСТОАРХИТЕКТониКИ МЕЖМЫШЕЧНОГО НЕРВНОГО СПЛЕТЕНИЯ В РАЗНЫХ ОТДЕЛАХ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У КРЫС ВИСТАР

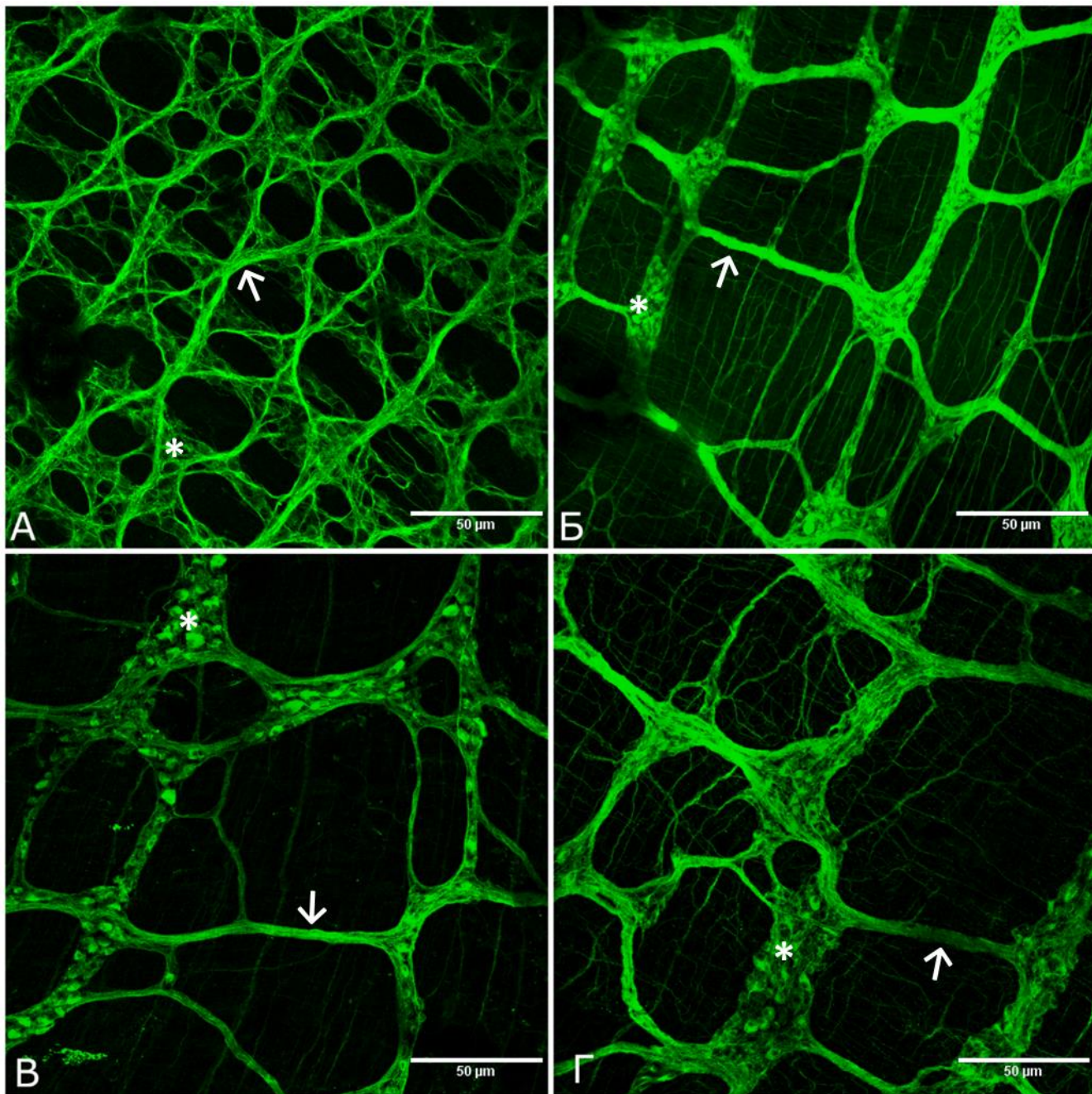
Энтеральная нервная система развивается из клеток нервного гребня, которые мигрируют в стенку кишки в двух противоположных направлениях (Furness J.B., 2006). К 14 суткам пренатального развития вся ОК колонизирована нейробластами (Lake J.I. and Heuckeroth R.O., 2013). В постнатальном развитии энтеральная нервная система ОК представлена двумя нервными сплетениями – межмышечным, иннервирующим мышечную оболочку, и подслизистым, иннервирующим слизистую оболочку и подслизистую основу (Furness J.B., 2006). Оба сплетения состоят из ганглиев и нервных отростков. В состав ганглиев входят нейроны, глия и их отростки. Энтеральная нервная система регулирует моторную и секреторную функции, благодаря ей совершаются рефлекторные акты. Большую часть времени толстый кишечник совершает перемешивающие и пропульсивные движения, что обеспечивает абсорбцию жидкости и формирование твердых каловых масс. Периодически совершаются направленные перистальтические движения, которые продвигают содержимое ОК в дистальном направлении (Hassler W., 2003). Одним из главных модуляторов морфофункционального состояния ОК является синтезируемый энтероэндокринными клетками и микрофлорой серотонин. Данные

литературы об изменении структуры нервной сети и клеточного состава ганглиев в постнатальном развитии фрагментарны, и получены на разных животных (Furness J., 2012).

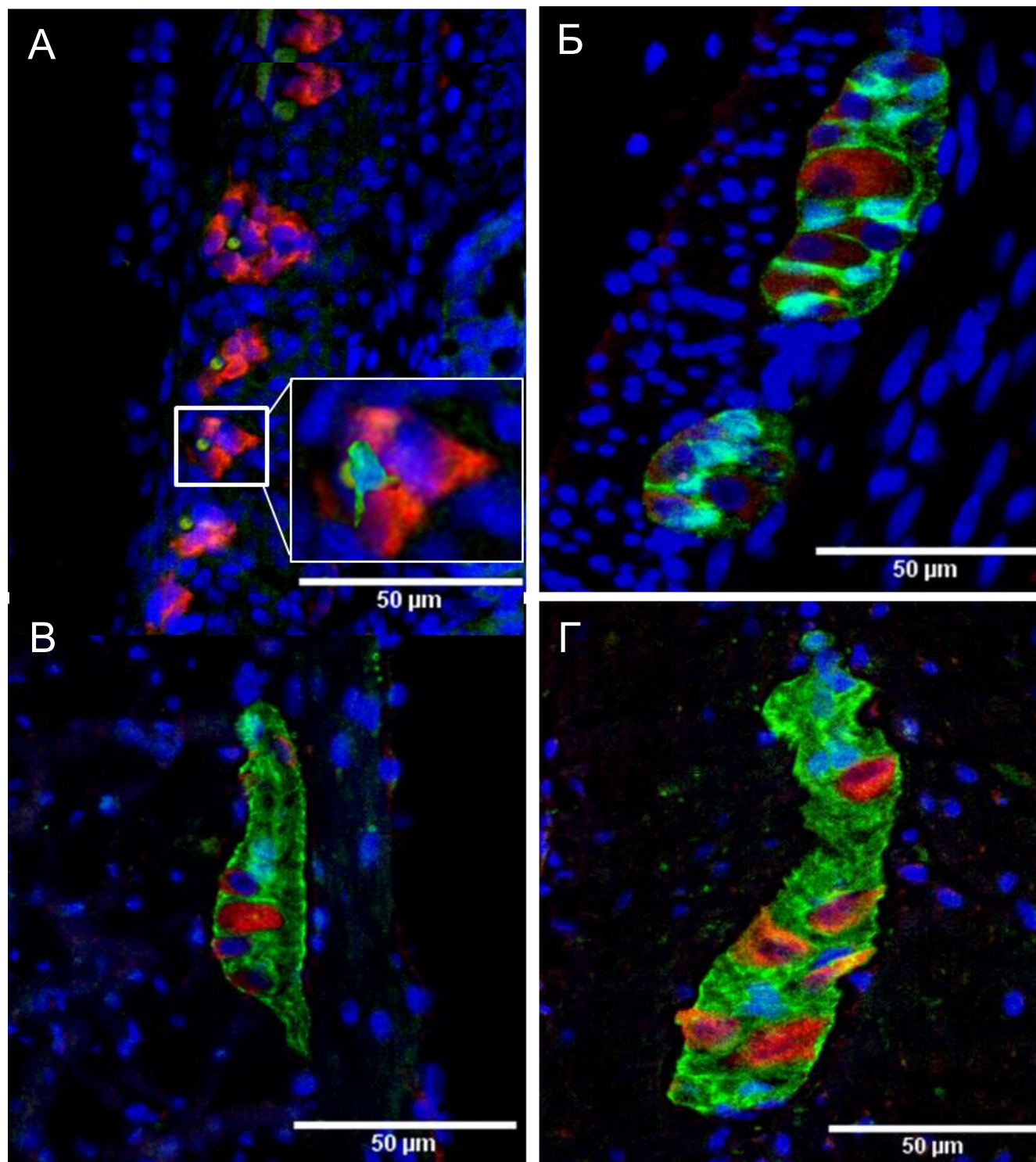
Гистоархитектонику межмышечного нервного сплетения изучали на тотальных препаратах, маркированных антителами к  $\beta$ III-тубулину (Рисунок 9). Нами показано, что у новорожденных крыс нервная сеть мелкоячеистая, нервные тракты относительно тонкие. К препубертатному возрастному периоду нервная сеть становилась разреженной - увеличивалась площадь межганглионарных пространств и толщина межганглионарных нервных трактов. У половозрелых и старых животных возрастных изменений не выявлено. В связи с увеличением линейных размеров ОК число ганглиев у препубертатных и половозрелых крыс снижалось. Площадь ганглиев в те же периоды постнатального развития, наоборот, увеличивалась.

Клеточный состав ганглиев межмышечного нервного сплетения выявляли на гистологических срезах, маркированных антителами к HuC/D (нейроны) и S100b (глиальные клетки). В период новорожденности ганглии межмышечного нервного сплетения были представлены нейронами и единичными глиальными клетками (Рисунок 10). Количество нейронов в ганглиях в постнатальном развитии у крыс не изменялось, а число глиальных клеток увеличивалось к препубертатному периоду и сохранялось стабильным у половозрелых и старых животных (Рисунок 11).





**Рисунок 9. Маркированные антителами к  $\beta$ III-тубулину тотальные препараты мышечной оболочки ободочной кишки крыс Вистар разных возрастных групп. А – период новорожденности: межмышечное нервное сплетение представлено скоплениями нейронов (\*), соединенными в сеть короткими нервными трактами (↑), образующими небольшие межганглионарные нервные пространства. Возрастные периоды: Б –препубертатный; В – половой зрелости; Г – старости. Межмышечное нервное сплетение представлено сформированными ганглиями, нервными трактами, большими межганглионарными пространствами**

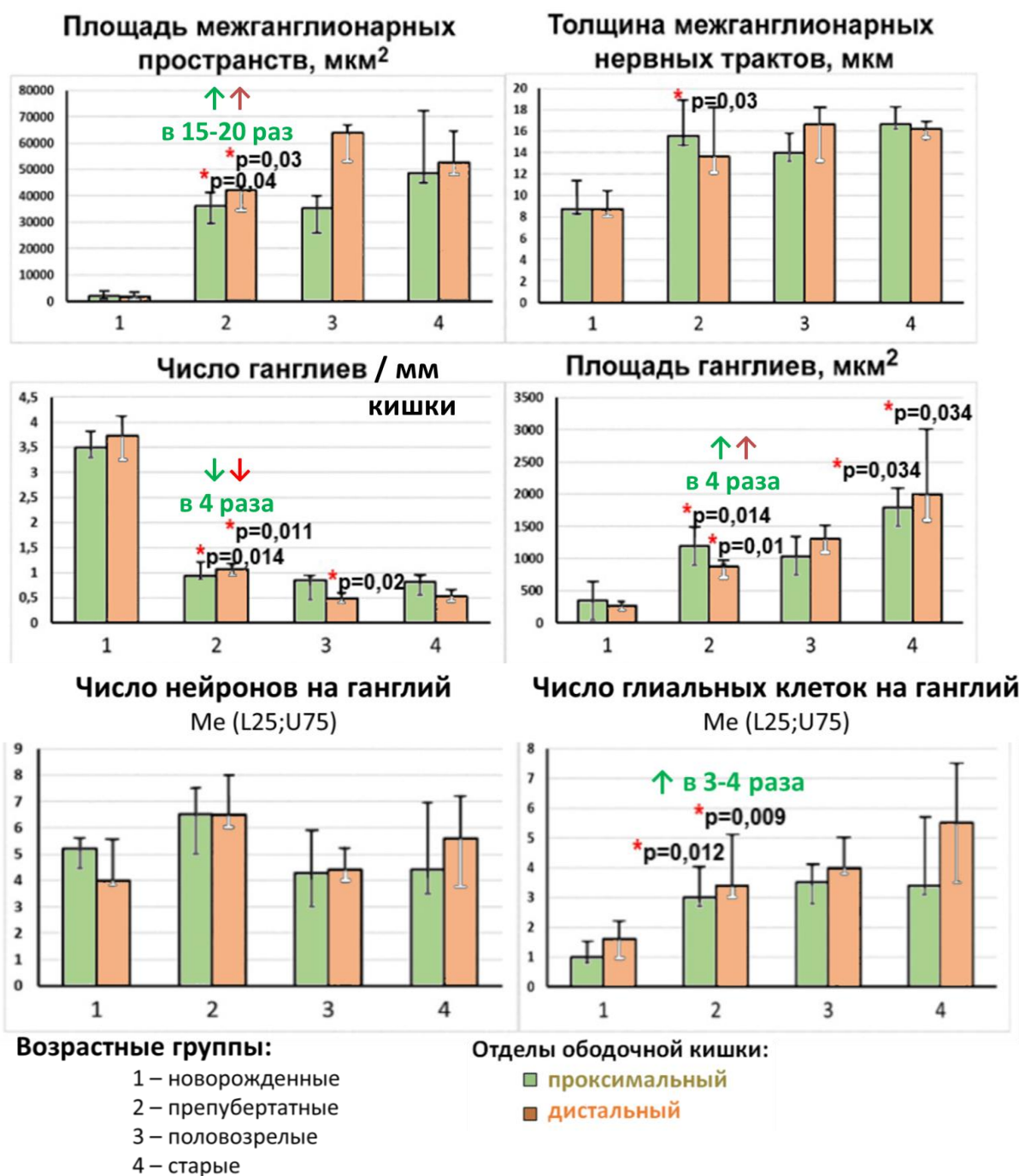


**Рисунок 10. Ганглии межмышечного нервного сплетения у крыс Вистар разных возрастных групп. Маркер тел нейронов - антитела к HuC/D (красный цвет) и глиальных клеток – S100b (зеленый цвет). В синий цвет окрашены ядра всех клеток (краситель DAPI). Ганглии новорожденных (А), препубертатных (Б), половозрелых (В) и старых (Г) крыс. Иммунофлуоресцентная микроскопия**

На гистологических срезах, маркированных антителами к  $\beta$ III-тубулину, проводили подсчет числа профилей внутримышечных нервных отростков. По данным морфометрической оценки, в период новорожденности число нервных отростков на  $1 \text{ мм}^2$  мышечной оболочки было максимальным. К препубертатному возрастному периоду их число снижалось, а толщина, наоборот, увеличивалась.



Снижение числа нервных отростков в мышечной оболочке в препубертатный возрастной период, очевидно, связано с увеличением толщины мышечной оболочки. Рост толщины внутримышечных нервных отростков в препубертатном периоде обусловлено процессами роста нервных волокон и увеличением числа глиальных клеток.



**Рисунок 11. Количественная характеристика межмышечного нервного сплетения ободочной кишки у крыс разных возрастных групп, Me (L25;U75). Различия статистически значимы: \* - при  $p < 0,05$  по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе (ANOVA Крускала-Уоллиса)**



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе результатов, полученных в работе с помощью комплекса современных методов исследования, систематизированы представления о возрастных морфофункциональных изменениях эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем разных отделов ободочной кишки у крыс Вистар. Установлено, что в период от новорожденности до препубертатного происходят наиболее значительные структурно-функциональные изменения ободочной кишки.

В период новорожденности у крыс эпителиальный барьер, в отличие иммунной и энтеральной нервной систем, уже сформирован - число бокаловидных клеток и содержание муцинов в них соответствует другим возрастным группам. Состав просветной микрофлоры в этот возрастной период характеризуется преобладанием таксонов *Firmicutes*, *Bifidobacteria*. Число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в кишке и крови в этот возрастной период минимальное. Агрегированные лимфоидные узелки у новорожденных крыс отсутствуют. Межмышечное нервное сплетение окончательно не сформировано: нервная сеть мелкочаечистая, в ганглиях содержатся единичные глиальные клетки.

В препубертатный возрастной период формируются крипты, увеличивается всасывающая поверхность ободочной кишки. В составе просветной микрофлоры преобладают таксоны *Firmicutes*, снижается количество *Bifidobacteria*, *Enterobacteria*. В стенке ободочной кишки выявляются агрегированные лимфоидные узелки и по сравнению с другими возрастными периодами их число максимальное. Межмышечное нервное сплетение сформировано: нервная сеть крупночаечистая, в ганглиях много глиальных клеток.

К периоду половой зрелости в бокаловидных клетках снижается содержание кислых сульфатированных муцинов, наиболее устойчивых к действию бактериальных гликозидаз, что, очевидно, обуславливает снижение устойчивости эпителиального барьера. В составе просветной микрофлоры преобладают таксоны *Firmicutes*, *Bacteroides*. В этот возрастной период число агрегированных лимфоидных узелков стабильное, но их площадь больше, чем в предыдущий возрастной период. Структура межмышечного нервного сплетения не отличается от таковой у животных препубертатного периода.

По сравнению с половозрелыми у старых крыс изменений состава просветной микрофлоры, состояния иммунной системы и структуры межмышечного нервного сплетения не выявлено, но защитные свойства эпителиального барьера снижены, что характеризуется уменьшением содержания нейтральных муцинов.

Во всех возрастных периодах выявлены структурно-функциональные региональные различия ободочной кишки. Во всех периодах постнатального онтогенеза в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным больше численность бокаловидных, но меньше – энтероэндокринных клеток, что связано с большим количеством бактерий в этом отделе ободочной кишки и менее выраженной моторной и абсорбционной функцией. В периоды от препубертатного до старости в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным агрегированные лимфоидные узелки характеризуются большей площадью и числом

узелков в них, что, очевидно, связано с максимально выраженной колонизацией микрофлоры в этом отделе.

## **ВЫВОДЫ**

1. В период от новорожденности до препубертатного у крыс Вистар увеличиваются линейные размеры ободочной кишки, наблюдается интенсивный рост толщины слизистой оболочки, подслизистой основы и мышечной оболочки. По сравнению с половозрелыми у старых крыс больше толщина мышечной оболочки.
2. Во всех периодах постнатального развития количество бокаловидных клеток в проксимальном отделе ободочной кишки меньше, чем в дистальном. В проксимальном отделе содержание высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках снижается к периоду половой зрелости, а нейтральных – к старости.
3. В процессе постнатального развития у крыс состав основных таксонов просветной микрофлоры устанавливается у половозрелых животных и сохраняется у старых.
4. С возрастом численность хромогранин А-позитивных энтероэндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс прогрессивно увеличивается, что сопровождается повышением содержания серотонина в ободочной кишке и периферической крови. В проксимальном отделе число энтероэндокринных клеток у препубертатных, половозрелых и старых животных больше, чем в дистальном, а у новорожденных количественные показатели не различаются.
5. Агрегированные лимфоидные узелки в ободочной кишке впервые обнаруживаются у препубертатных крыс. С возрастом их количество снижается, а площадь, напротив, увеличивается. Показатели средней площади и числа узелков в агрегированных лимфоидных узелках выше в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным.
6. По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс сеть межмышечного нервного сплетения с возрастом становится более разреженной, снижается число и увеличивается толщина нервных отростков. В ганглиях количество нейронов с возрастом не изменяется, а глиальных клеток увеличивается до препубертатного периода и в последующих периодах не изменяется.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Тихонов Е.А. Структурные изменения пейеровых бляшек у самцов крыс Вистар в постнатальном онтогенезе / Тихонов Е.А., Пономаренко Е.А., Мхитаров В.А., Макарова О.В. // Морфологические ведомости. - 2014. - №1. - С. 85-94
2. Тихонов Е.А. Структурные изменения агрегированных лимфоидных узелков толстой кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар / Тихонов Е.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т. 159. - №5. - С.622-625
3. Тихонов Е.А. Возрастные изменения популяции энтерохромаффинных клеток и содержания серотонина в разных отделах ободочной кишки / Тихонов Е.А. // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2016. – Т. 20. - №4. - С. 49-54
4. Тихонов Е.А. Возрастные изменения гистоархитектоники миентерального нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар / Тихонов Е.А., Макарова О.В., Голиченков В.А. // Архив анатомии и гистопатологии. - 2017. - №3 - С. 75-81
5. Тихонов Е.А. Гистофизиологические особенности разных отделов ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар / Тихонов Е.А. // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2017. - №3. С. 56-61
6. Тихонов Е.А. Возрастные изменения агрегированных лимфоидных узелков толстой кишки у крыс Вистар / Тихонов Е.А. // Экологические аспекты морфогенеза: Сб. научных трудов Всероссийской научной конференции. - Воронеж.- 2015 – С. 19-22
7. Тихонов Е.А. Изменения содержания серотонина и числа энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар в постнатальном онтогенезе / Тихонов Е.А., Макарова О.В. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии: : Сб. научных трудов Всероссийской научной конференции. – М. – 2016. - С. 180-181
8. Tikhonov E.A. The change of the 5-HT content and the number of enteroendocrine cells in different regions of the colon in postnatal development of Wistar rats / Tikhonov E.A. // Международная научная конференция «PhD Scientific Days 2017» Budapest, 11–12 April, 2017, <http://phd.kmcongress.com/osszefoglalo/1955> (дата обращения 29.05.2017)

Автор: